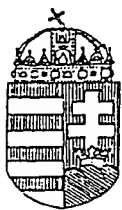


(19) Országkód:

HU



MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

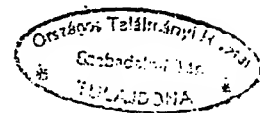
208 089 B

(21) A bejelentés száma: 2524/89  
(22) A bejelentés napja: 1989. 04. 18.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
P 38 13 043 1988. 04. 19. DE  
88 118243 1988. 11. 02. EP  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/DE 89/00233  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 89/10139

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 39/395

(40) A közzététel napja: 1991. 05. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1993. 08. 30. SZKV 93/08



(72) Feltalálók:

Dichtelmüller, Herbert, Sulzbach (DE)  
Stephan, Wolfgang, Dreieich (DE)  
Lissner, Reinhard, Weilbach (DE)  
Arndt, Rüdiger, Hamburg-Blankenese (DE)

(73) Szabadalmas:

Biotest Pharma GmbH., Dreieich (DE)

(74) Képviselő:

S.B.G. és K. Ügyvédi és Szabadalmi Iroda,  
Budapest

(54) Eljárás immunglobulin koncentrátumok és ezeket tartalmazó  
gyógyszerkészítmények előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás immunglobulin hatóanyag előállítására nem-immunizált szarvasmarhák előtejéből (colostrum). A hatóanyag immunglobulin-tartalma magas, ugyanakkor antikomplementer-aktivitása alacsony. Emberek orálisan, állatoknak intravénásan is adható önmagában vagy gyógyszerkészítmény alakjában bakté-

riumok- vagy toxinok-okozta betegségek, különösen az AIDS-betegek vagy más immunhiányban szenvedők súlyos hasmenése, az „utazók hasmenése”, a csecsemők toxin-okozta hasmenése, gyomor- és nyombélfekélyek, krónikus és akut Yersinia-fertőzések vagy protozoonok okozta megbetegedések kezelésére.

HU 208 089 B

A találmány tárgyát egy magas ellenanyag-tartalmú, nem immunizált emlősök előtejéből (colostrum, főcstej) előállított immunglobulin hatóanyag, valamint olyan gyógyászati készítmények előállítása képezi, amelyek a fenti hatóanyagot tartalmazzák vagy abból állnak, és bakteriális vagy toxinok okozta megbetegedések – különösen az AIDS-szel kapcsolatos hasmenés és más immunhiányos kórképek, az utazók hasmenése, a csecsemők toxin-ozta hasmenése, a gyomor- és bélfekélyek, akut és idült Yersinia-fertőzések vagy protozoonok (egysejtű állati véglények) okozta fertőzések – kezelésére használhatók.

Az immunglobulinokat – ezeket a magas biológiai aktivitású, ugyanakkor érzékeny fehérjéket – bakteriális és vírális megbetegedések, valamint – adott esetben speciális készítmények formájában – meghatározott toxinok okozta mérgezések megelőzésére és kezelésére használják. Előállításuk viszonylag nehézkes eljárásokkal emberi vérplazmából, vagy valamivel egyszerűbb módon tejből, illetve emlősök előtejéből történik. Az emberi plazmából nyerhető immunglobulinokhoz tartozik például az immunglobulin-G is, amely egy, a különböző fertőzések megelőzésére és kezelésére használható fehérje.

Az eddig ismert, tejből vagy előtejből előállított, immunglobulin-tartalmú készítmények alacsonyabb tisztaságúak, mint az emberi plazmából kapottak, ezért elsősorban az állatgyógyászatban használják azokat fertőzéses megbetegedések kezelésére.

Az immunglobulinok tejből vagy előtejből történő kinyerésére számos eljárást ismerünk. A 3 128 230 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint bakteriális fertőzések kezelésére alkalmas készítményt állítanak elő tejből. A 4 265 925 sz. amerikai egyesült államokbeli és a 0 573 995 sz. nagy-britanniai szabadalmi leírás szerint nagyrészt hődenaturált – egy hőkezelés folytán – fehérjéket tartalmazó koncentrátumot állítanak elő tejszérumból. A 28 13 284 sz. NSZK-beli közzétételi irat, valamint a 0 046 909 és a 0 064 103 sz. európai szabadalmi leírások nyomán előtejből készíthetők gyulladásgátló hatású immunglobulin-koncentrátumok.

A 4 051 235 sz. amerikai egyesült államokbeli, valamint a 6 075 433 sz. japán szabadalmi leírás ugyancsak olyan főcstej-feldolgozási eljárást ismertet, amelynek során gyulladásgátló hatású szerekben alkalmazható, immunglobulin-tartalmú termékekhez lehet jutni.

A gyógyhatású, immunglobulin-tartalmú készítmények előállításának alapanyaga a fenti eljárások szerint hiperimmunizált emlősök – elsősorban szarvasmarha – teje vagy előteje lehet, így meghatározott kórokozók szembeni antibakteriális vagy antivirális hatás elérésére először az állatokat kell egy vagy több antitestet vagy csoportspecifikus antitestet indukáló baktérium-törzsekkel vagy azok antigénjeivel immunizálni. Az így előállított készítmények hatása megfelel az immunizálásra használt baktérium(ok)énak. Ha egy adott (pl. bakteriális) antigénre specifikus ellenanyagot tartalmazó készítményt kívánunk tejből előállítani, úgy az

állatokat a tisztított antigénnel kell immunizálni. Ezen a módon olyan magas ellenanyag-űtert kaphatunk, hogy a tej lényegében a specifikus antitest hordozóanyagának tekinthető.

5 Találmányunk kidolgozásához vezető munkánk célja az volt, hogy egy olyan, magas tisztaságú és magas ellenanyag-aktivitású immunglobulin készítményt állítsunk elő egyszerű és gazdaságos módon, amely mind a humán-, mind az állatgyógyászatban  
10 alkalmazható, de amelynek előállítása nem igényel előzetes hiperimmunizációt, meghatározott antitest szint biztosítására.

Feladatunkat úgy oldottuk meg, hogy immunglobulint állítsunk elő szarvasmarhák előtejéből, amelyet az  
15 elléstől számított első 30, előnyösen első 10 órán belül fejünk le. Ennek során a főcstejet desztillált vízzel hígítjuk, majd pasztörözzük; a zsírt elkülönítjük és a kazeint kicsapjuk, majd elkülönítjük; végül az így kapott főcstejsavót 145 °C bemeneti és 65 °C kilépési hőmérséklet mellett porlasztva szárítjuk. Így magas tisztaságú, az összfehérje-tartalom 80%-át meghaladó immunglobulin-tartalmú, ugyanakkor alacsony zsír-  
20 (<0,4%) és laktóz- (<0,1%) tartalmú immunglobulin hatóanyagot kapunk, amelynek antitest-aktivitása nagyobb, mint az eddig ismert leghatékonyabb emberi immunglobulin-készítmény, a Pentaglobin<sup>R</sup> szintje. Mivel a találmány szerinti készítmény antikomplement-aktivitása rendkívül alacsony, a humán gyógyászatban orálisan (szájon át), az állatgyógyászatban pedig intravénásan alkalmazható.

A találmány szerint például úgy járunk el, hogy a szarvasmarhák előtejét – amelyet az ellés utáni első 10 órán belül fejünk le – 1:3 arányban hígítjuk desztillált vízzel, az oldatot pasztörizáljuk, a tejszínt eltávolítjuk, a kazeint kicsapjuk és (például szűréssel) eltávolítjuk;  
35 majd az így kapott savót a kívánt mértékig koncentrálnak.

Porlasztva szárítással végzett stabilizálás után por alakú terméket kapunk. Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a porlasztva szárításhoz szükséges hőmérsékleten (145–180 °C belépő és 65–70 °C kilépő hőmérséklet) a készítmény fehérjei nem denaturálódnak, így ilyen porlasztva szárítási körülmények között elmarad az ilyen hőmérsékleten ismert aggregálódás és az antikomplement-aktivitás már várható fokozódása is. Ennek a stabilizáló módszernek az alkalmazásával tehát ugyan-  
40 csak 80%-ot meghaladó immunglobulin-tartalmú, változatlanul alacsony antikomplement-aktivitású és teljes biológiai aktivitású preparátumot állíthatunk elő.

A fent leírtak mellett, a porlasztva szárítás előtt egy további, ugyancsak ismert módszerrel – oktánsavval történő kicsapással – tovább dúsíthatjuk a készítmény immunglobulin-tartalmát. Az így elérhető immunglobulin-tartalom meghaladhatja a 90%-ot is, az antikomplement-aktivitás emelkedése nélkül.

55 Immunglobulint tartalmazó, magas antitest-aktivitású preparátum más, ugyancsak ismert módszerekkel is előállítható az ellés után 10 órán belül fejt főcstejből. Ilyen eljárást ír le pl. a 3 433 718 sz. NSZK-beli szabadalmi leírás, amely szerint nemimmunizált szarvasmarhák főcstejét először megsavanyítják és durván  
60

megszűrjük (a kazein eltávolítására), majd konyhasó-oldattal hígítjuk, az így kapott szuszpenziót tangenciális szűrővel derítjük, koncentrálnak és közömbösítjük. A koncentrált savó stabilizálása porlasztva szárítással történhet, adott esetben egy oktánsavas kicsapással kombinálva a készítmény tisztaságának fokozása céljából.

#### Az immunglobulin-preparátumok előállítása

##### 1. példa

110 kg mélyfagyasztott, az ellés után 10 órán belül fejt marha-főcstejet 5–10 °C-ra felmelegítünk és desztillált vízzel 1:3 arányban felhígítunk. A hígított tejet pasztörözzük és a tejszírt eltávolítjuk, majd a kapott 270 kg sovány tejet 1 N sósav-oldattal megsavanyítjuk és a kivált kazeint szűrőkendővel kiszűrjük. A 186 kg felülúszó tejsavót ultraszűrővel 38 kg-ra koncentrálnak, majd porlasztva szárítással tartósítjuk. A porlasztva szárító belépő hőmérséklete 175 °C, kilépő hőmérséklete 65 °C. A kapott száraz por 83% (3,8 kg) immunglobulint tartalmaz; szárítás utáni ellenanyag-aktivitása megfelel a szárítás előtt mért ellenanyag-aktivitásnak.

##### 2. példa

13 l, az ellés után 5 órán belül fejt és mélyhűtött főcstejet felmelegítünk; a tej pH-ja 6,27. 700 ml 1 N sósavoldat hozzáadásával a pH-t 4,8-re állítjuk, a szuszpenziót 30 percen át 40 °C hőmérsékleten tartjuk, majd egy éjszakán át tároljuk 4 °C-on. Másnap a durvább részecskéket poliamid-gézzel kiszűrjük, a szuszpenziót 26 l össztérfogatra hígítjuk 0,9%-os (fiziológiás) konyhasó-oldattal, majd egy 3 m<sup>2</sup> felületű, 0,4 µm átlagos pórusméretű, 1,2 mm rostvastagságú tangenciális szűrőpatronon át diafiltráljuk 100 l fiziológiás konyhasó-oldattal, 20–60 kPa túlnyomással. A szűrletet folyamatosan diafiltráljuk tovább egy második lépésben, 3 szűrőpatronon, amelyeknek felülete külön-külön 1,4 m<sup>2</sup>, elválasztási határa 10 000 dalton. 100 liter 0,9%-os nátriumklorid oldattal végzett diafiltrálás során végül az oldatot 25 l térfogatra koncentrálnak, és az alacsony molekulatömegű alkotórészeket tartalmazó szűrletet elöntjük.

10 liter 10% immunglobulin-tartalmú oldatot porlasztva szárítunk 145/65 °C hőmérsékleten. 1270 g fehérés immunglobulin-port kapunk, amelynek ellenanyag- és antikomplementer-aktivitása megfelel a szárítás előtt preparátumból mért értékeknek.

##### 3. példa

200 ml, az 1. példa szerint előállított immunglobulin-oldathoz a tartósítás előtt (pH = 4,8) 2,5% oktánsavat adunk és 23 °C hőmérsékleten tartjuk 5 órán át, majd a kivált csapadékot szűrővel eltávolítjuk és az oldatot fiziológiás konyhasó-oldattal szemben dializáljuk és porlasztva szárítjuk. Az így kapott hatóanyag immunglobulin-tartalma több, mint 90%, antikomplementer-aktivitása pedig alacsonyabb, mint egy intravénásan adható emberi IgG-készítményé.

##### 4. példa

200 ml 5% fehérjét tartalmazó oldatot állítunk elő

az 1. példa szerint kapott (porlasztva szárított) immunglobulin porból. Az oldat fehérje-összetevőinek mennyisége (±10% pontossággal) a következő:

összfehérje	4,2 g/100 ml
ebből IgG	3,0 g/100 ml
IgA	0,35 g/100 ml
IgM	0,96 g/100 ml
pH	4,6
laktalbumin	1,0%

Az oldatot 2,5% oktánsavval inkubáljuk pH 4,8-en, 23 °C hőmérsékleten, 5 órán át, majd a csapadékot centrifugáljuk és a felülúszót diafiltráljuk. Az oldat antikomplementer-aktivitása megfelel egy azonos koncentrációjú (5%), intravénás adásra alkalmas, emberi IgG-készítményének.

A leírt eljárásokkal, vagy azokkal analóg módon elkészített immunglobulin-preparátumok ellenanyag-aktivitása magasabb, mint a Pentaglobiné.

##### Baktérium-toxinok semlegesítése

A baktériumok hemolízist okozó toxinjainak semlegesítését különböző baktériumok toxintartalmú tápfolyadékában vizsgáljuk, a hemolízis gátlást kimutató szokásos valamelyik eljárással.

##### 5. példa

Staphylococcus aureus Smith 3 baktérium-törzset egy éjszakán át tenyésztünk marhaszív-levesben, majd háromszor centrifugáljuk (10 000 g, 10 perc) és a felülúszót sterilre szűrjük. A 2. példa szerinti immunglobulin-készítményből 5%-os oldatot készítünk a toxinsemlegesítési hatás vizsgálatára. Ennek során 0,1 ml mosott humán eritrocitát és 10 µl Staphylococcus aureus toxint 900–990 µl 0,9%-os NaCl oldatban 37 °C-on 30 percen át inkubálunk és eközben ismételt 10–100 µl 5%-os immunglobulin oldatot adagolunk. Összehasonlító készítményként Pentaglobinből készült, 5%-os oldatot használunk.

Az eredményeket az 1. ábrán mutatjuk be.

##### 6. példa

Az 5. példában leírt toxinsemlegesítési vizsgálatot egy Gram-negatív baktérium, a Pseudomonas aeruginosa toxintartalmú felülúszójával végezzük el. 5%-os immunglobulin-oldattal az 5., illetve 7. példában leírtak szerint, miután az oldatot 0,9%-os NaCl-dal 1:10 arányban hígítottuk, végezzük a vizsgálatot (0–100 µl oldat alkalmazása mellett).

##### 7. példa

Az 5. példában leírt vizsgálatot a Staphylococcus aureus toxinjával és az 1. példa szerint előállított (porlasztva szárított) preparátum fiziológiás sóoldattal 1:10 arányban hígított oldatával végezzük el; kontrollként a Pentaglobin hasonló oldatát használjuk.

Az 5–7. példában leírt kísérletek eredményeit az 1–3. ábrákon mutatjuk be.

Az 1. ábra a Staphylococcus aureus Smith 3 hemolizáló toxinjainak semlegesítését mutatja be a marhafőcstejből a 2. példa szerint előállított immunglobulin-

preparátummal és Pentaglobinnal, mint összehasonlító készítménnyel (5. példa).

A 2. ábra a *Pseudomonas aeruginosa* toxinjának semlegesítését mutatja be a marha-főcstejből a 2. példa szerint előállított immunglobulin-preparátummal (6. példa).

A 3. ábra a *Staphylococcus aureus* Smith 3 toxinjának semlegesítését mutatja be az 1. példa szerint előállított immunglobulin-preparátummal (7. példa).

Mindhárom ábrából megállapítható, hogy a marha-főcstejből előállított immunglobulin-preparátum hatásosabban gátolta a toxinok okozta hemolízist, mint az összehasonlításra használt, emberi plazmából előállított Pentaglobin. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

Példa	az 50%-os és 80%-os toxin-semlegesítéshez szükséges immunglobulin (μl)	
5. Pentaglobulin (összehasonlító)	50	93
főcstej preparátum (találmány szerinti)	10	50
6. főcstej preparátum (találmány szerinti)	18	35
7. Pentaglobin (összehasonlító)	42	80
főcstej preparátum (találmány szerinti)	10	40

Az 5. és 7. példa mérései szerint a Pentaglobinból mintegy háromszoros mennyiségre van szükség a toxin 50%-os semlegesítéséhez, míg 80%-os semlegesítéshez kétszeres mennyiséget kell használni. A 6. példa adataiból látható, hogy a találmány szerinti immunglobulinból már igen kis mennyiség (40 μl) is elég a Gram-negatív baktérium toxinjának csaknem 100%-os semlegesítéséhez.

A Pentaglobinnal az alkalmazott adagban (5%-os oldat, 100 μl) sem sikerült 100%-os toxin-semlegesítést elérni. Figyelembe véve, hogy a főcstejből előállított immunglobulin-preparátumok a Pentaglobinnal szemben nem 100, hanem csak 80–90%-os tisztaságúak, a fenti tényből arra következtethetünk, hogy a találmány szerinti antitoxinok terápiás indexe az antitoxinhatás területén legalább kétszerese az ismert Pentaglobinénak.

Mind a táblázatból, mind az ábrából levonható továbbá az a következtetés is, hogy az előállítás módja nem befolyásolja a találmány szerinti termékek aktivitását, így előállításukra akár a tejipar ismert eljárásait, akár különleges eljárásokat (például tangenciális szűrést) használhatunk.

A találmány szerinti termékek az állatgyógyászatban intravénásan, embereknek orálisan adhatók. A kö-

vetkező példák tanúsága szerint nem toxikusak és mind folyékony, mind szilárd alakban tárolhatók.

#### Összeférhetőség – toxicitás

##### 8. példa

Öt 17 g testtömegű egeret kezeltünk intraperitoneálisan a 6–8. példák szerinti immunglobulin-oldattal (0,29 g immunglobulin/tt.kg). Az állatokat 3 órán át megfigyeltük, majd további öt napon át ellenőriztük.

Eredmény: sem elhullás, sem azonnali reakció, sem késleltetett (3 órán belül fellépő) reakció nem volt megfigyelhető. Az állatok a későbbiekben sem mutattak eltérést.

##### 9. példa

Öt 17 g-os testtömegű egeret gyomorszájából át, orálisan kezeltünk 0,5 ml 5%-os immunglobulin oldattal (1,47 g immunglobulin/tt.kg; pH = 4,6). Az állatokat 5 órán át megfigyeltük, majd további öt napon át ellenőriztük.

Eredmény: sem elhullás, sem azonnali reakció, sem késleltetett (5 órán belül fellépő) reakció nem volt megfigyelhető. Az állatok a későbbiekben sem mutattak eltérést.

##### 10. példa

Három 20 g-os testtömegű egeret gyomorszájából át, orálisan kezeltünk 1,0 ml 10%-os immunglobulin-oldattal (0,1 g immunglobulin/állat = 5,0 g/tt.kg; pH = 4,6).

Eredmény: a kezelés után 1, 3 és 24 órával az állatokon semmilyen tünet nem volt megfigyelhető és az öt napos megfigyelési idő után sem mutattak eltérést.

A fentiek alapján megállapítható, hogy a főcstejből készült immunglobulin-preparátumok igen gazdaságosan állíthatók elő és ugyanakkor váratlanul magas antitoxin aktivitást mutatnak a baktérium-toxinokkal szemben; összeférhetetlenségük kiváló (nem toxikusak), magas tisztaságúak (90%) és mind folyadékként, mind szilárd alakban tartósítva tárolhatók.

##### 11. példa

Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a találmány szerinti készítmények alkalmasak a következményként fellépő, így a HIV-fertőzés (AIDS) vagy más immunhiányos állapotokban bekövetkező hasmenés kezelésére. A találmány szerinti készítmény adagolása rövid időn belül csökkentő a székelések számát, majd teljesen megszünteti a hasmenést. A 2. táblázatban három AIDS-beteg kezelésének (10 g készítmény/nap orálisan, 10 napon át) eredményét mutatjuk be.

2. táblázat

Beteg	kezelés előtti	hasmenéses széklet/nap				testtömeg	
		kezelés napja				kezelés	
		1	3	5	10	előtti	utáni
(1)	10	5	1	1	1	42,0	n.m.
(2)	6	1	0*	0*	0*	84,4	84,5
(3)	10	5	2	2	1	62,3	62,8

\* normális széklet

A találmány szerinti készítményeket önmagukban vagy más hasmenés elleni szerekkel (antidiarrhoica, obstipantia) kombinálva, az egyébként szükséges gyógyszerek mellett is adhatjuk. Mivel már rövid időn belül is csökkenthetik a hasmenéses székélések számát, hatásosan hozzájárulnak a beteg általános állapotának javulásához.

#### 12. példa

Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a találmány szerinti készítmények az „utazók hasmenése” kórkép és a csecsemők toxikus hasmenése esetében is jó eredménnyel alkalmazhatók.

Laboratóriumi kísérletekben megállapítottuk, hogy a találmány szerinti készítmények többek között a 40 kd molekulatömegű verotoxin 1 (VT 1) semlegesítésére képes antitestet is tartalmazzák. A VT 1 (más néven Shiga-toxin 1) és a verotoxin 2 a patogén *Escherichia coli* törzsek exotoxinjai: ezek felelősek a csecsemők hasmenésének tüneteier. Az utazók hasmenését viszont az enterotoxin-termelő *E. coli* törzsek okozzák; a 30 és 40 kd molekulatömegű, hőérzékeny enterotoxin-fehérjék ellenanyagai is megtalálhatók a készítményekben.

A fentiek szerint a patogén *E. coli* törzsek teljes toxin-készlete ellen van megfelelő ellenanyag a találmány szerinti készítményekben. A készítmények ezen tulajdonsága különösen előnyös, mert ezek a betegségek gyakran és éppen anitiotikummal végzett kezelések következményeként lépnek fel, vagy az antitiotikumok adagolásának lehetnek negatív mellékhatásai a toxikózisban szenvedő betegekben.

Az immunoblot-technikával végzett kísérletek eredményeit a 4a és 4b ábrán mutatjuk be.

#### 13. példa

Gyomorhuruthoz (gastritis) társuló gyomor- és nyombélfekélyeket bizmutsókkal és antitiotikumokkal kezelnek. Az egyszerű és mellékhatás-mentes kezelés (bizmutsókkal) nem eléggé hatásos, míg az antitiotikum-kombinációk hatása biztonságos, de rutinszerű alkalmazásuk mellékhatásokkal jár: ezek a kórképek még mindig igényelnek egy mellékhatásoktól mentes, de hatásos terápiát. Mai ismereteink szerint mind a fenti kórképekben, mind más jellegű emésztési zavarokban (diszpepsziák) kóroki szerepe van a *Campylobacter pylori*-nak, amelynek fontosabb antigénjei egy 120 kd-os külső membránfehérje, egy 69 kd-os csillófehérje (flagellin) és egy 45 kd-os ureáz enzimfehérje.

Kísérleteink során meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a találmány szerinti készítmények nagy mennyiségben tartalmazzák mindhárom antigén antitestjeit. A vizsgálatokat immunoblot-technikával végeztük; a készítményt 4 mg/ml fehérjetartalmú oldatként, hígítatlanul illetve 1:10 és 1:100 arányban hígítva használtuk. A kimutatás alkalikus foszfátazzal kapcsolt marha-IgG-vel történt. Az 5. ábrán látható, hogy a készítmény kétszeres hígításban mindhárom antigénnel, százszoros hígításban pedig a flagellinnel és az ureázzal még jól kimutathatóan reagált. A fentiek mellett még számos, a

*C. pylori*-ból készült preparátummal reagáló antitest is volt a készítményben.

A fentiek alapján meglepetéssel állapíthatjuk meg, hogy a találmány szerinti készítmények a *Campylobacter pylori* által okozott fertőzések kezelésére is használhatók.

#### 14. példa

A *Yersinia*-fertőzések nem vagy nem csak heveny bélhurut (enteritis), hanem főleg szubakut vagy krónikus kórképek formájában zajlanak le, amelyek esetében a kórokozó kitenyésztése rendszerint eredménytelen marad és az immun-eredetű szöveti reakciók uralják a képet. A legfontosabb ilyen megbetegedések – amelyekben az IgA-antitestek megemelkedése jelzi a fertőzést – a reaktív ízületi gyulladások, az eritema nodosum, az uveitis (a szemgolyó középső rétegeinek gyulladása) és a krónikus bélhurut.

A *Yersinia*-fajok mindegyike rendelkezik három, úgynevezett YOP-antigénnel (YOP2b = 47 kd, YOP3 = 37 kd, YOP5 = 26 kd). Az izolált antigének és a találmány szerinti készítmény reakcióját Western-blot technikával vizsgáltuk: a készítményt 4 mg/ml fehérjetartalmú oldatként és 1:10; illetve 1:100 arányban hígítva használtuk. A 6. és a 7. ábrán látható, hogy a készítmény mindhárom antigénnel reagált még százszoros hígításban is. Az előhívást alkalikus foszfátazzal kapcsolt anti-marha-IgG-vel (H- és L-láncra specifikus), 1:1500 és 1:3000 hígításban végeztük.

Mivel a vizsgált antigének az összes *Yersinia*-faj minden törzsében közősek, megállapíthatjuk, hogy a találmány szerinti készítmények kiválóan alkalmasak a *Yersinia*-fertőzések kezelésére.

#### 15. példa

A találmány szerinti készítmények meglepetésünkre alkalmasak protozoonok, például *Cryptosporidium*-ok, *Isospora belli* vagy *Toxoplasma Gondii* okozta megbetegedések kezelésére, amely megbetegedések közül többnek ma még nincs hatásos gyógyszere.

A *Cryptosporidium*-ok olyan súlyos hasmenést okozhatnak, aminek – főleg az immunhiányos betegekben – kezelésére nincs hatásos gyógyszerünk. Négy olyan, súlyos hasmenésben szenvedő beteget, akinek székletéből a *Cryptosporidium* kimutatható volt, kezeltünk 10 g készítménnyel naponta, 10 napon át (a készítményt ivólében oldottuk fel). A kezelés végén a betegekben nem lehetett *Cryptosporidium*-antigént kimutatni.

### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás immunglobulin hatóanyag előállítására szarvasmarhák ellés utáni 30, előnyösen 10 órán belül kifejt előtejéből (a colostrumból), az előtej desztillált vízzel történő hígításával, a hígított előtej pasztörözésével, a tejzsír eltávolításával és a kazein kicsapásával és eltávolításával, *azzal jellemezve*, hogy az így kapott előtejsavót 145–180 °C bemeneti, és 65–70 °C kimene-

ti hőmérséklet mellett porlasztva szárítjuk. (Elsőbbsége: 1988. 04. 19.)

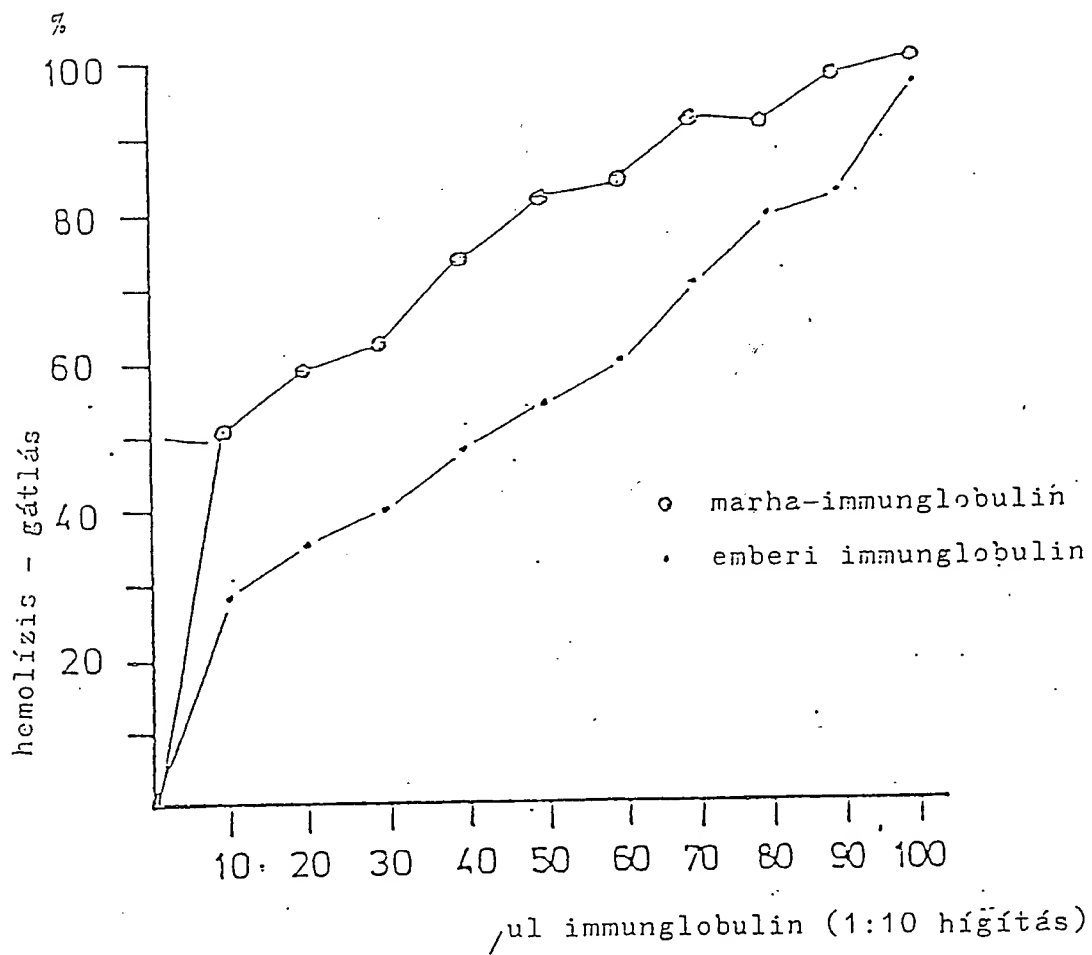
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az előtejsavót a porlasztva szárítás előtt töményítjük. (Elsőbbsége: 1988. 04. 19.)

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az előtejsavót a porlasztva szárítás előtt oktánsavval kezeljük. (Elsőbbsége: 1988. 04. 19.)

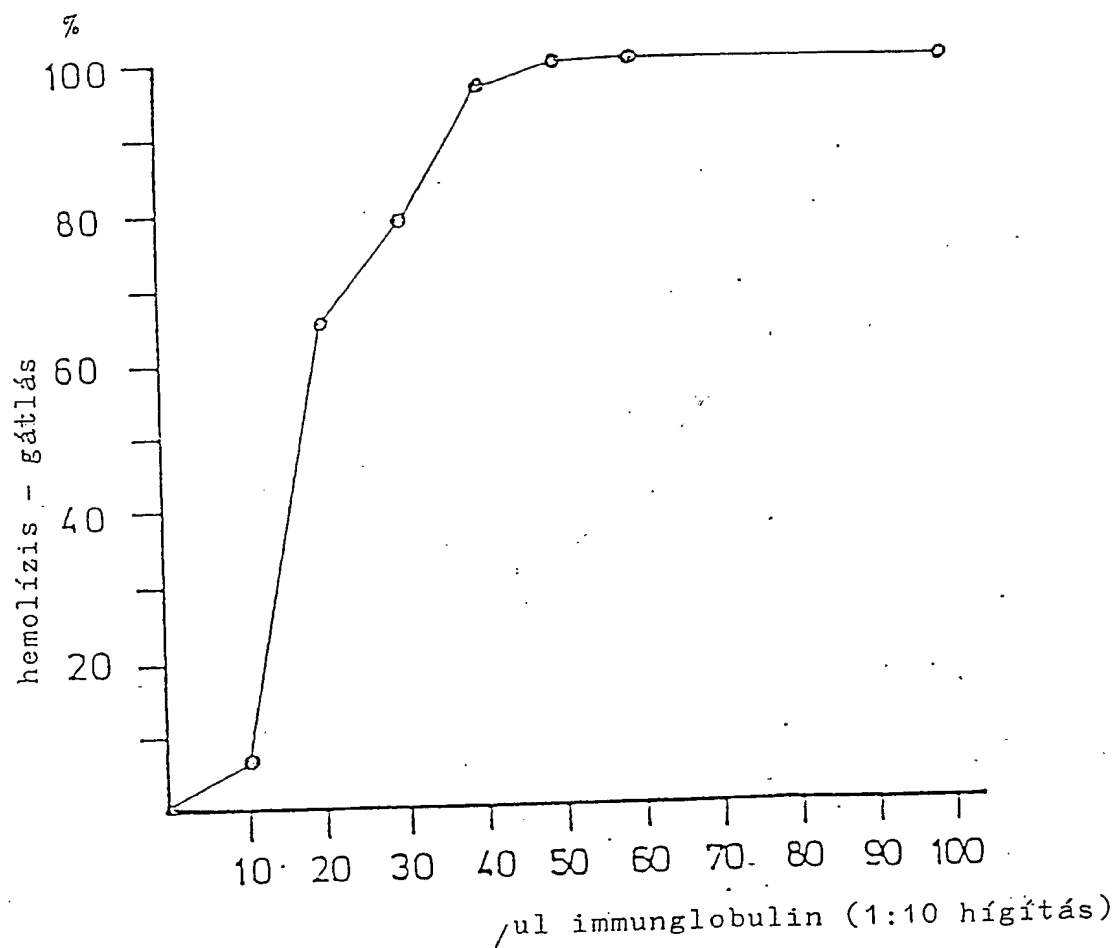
5

4. Eljárás bakteriális, protozoa eredetű vagy toxinok okozta megbetegedések, gyomor- és bélbetegségek vagy immunhiányos állapotok kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1.-3. igénypontok bármelyike szerint előállított hatóanyagot önmagában vagy a szokásos gyógyszerkészítési segédanyagokkal összekeverve ismert módon formázzuk. (Elsőbbsége: 1988. 11. 02.)

1. ábra

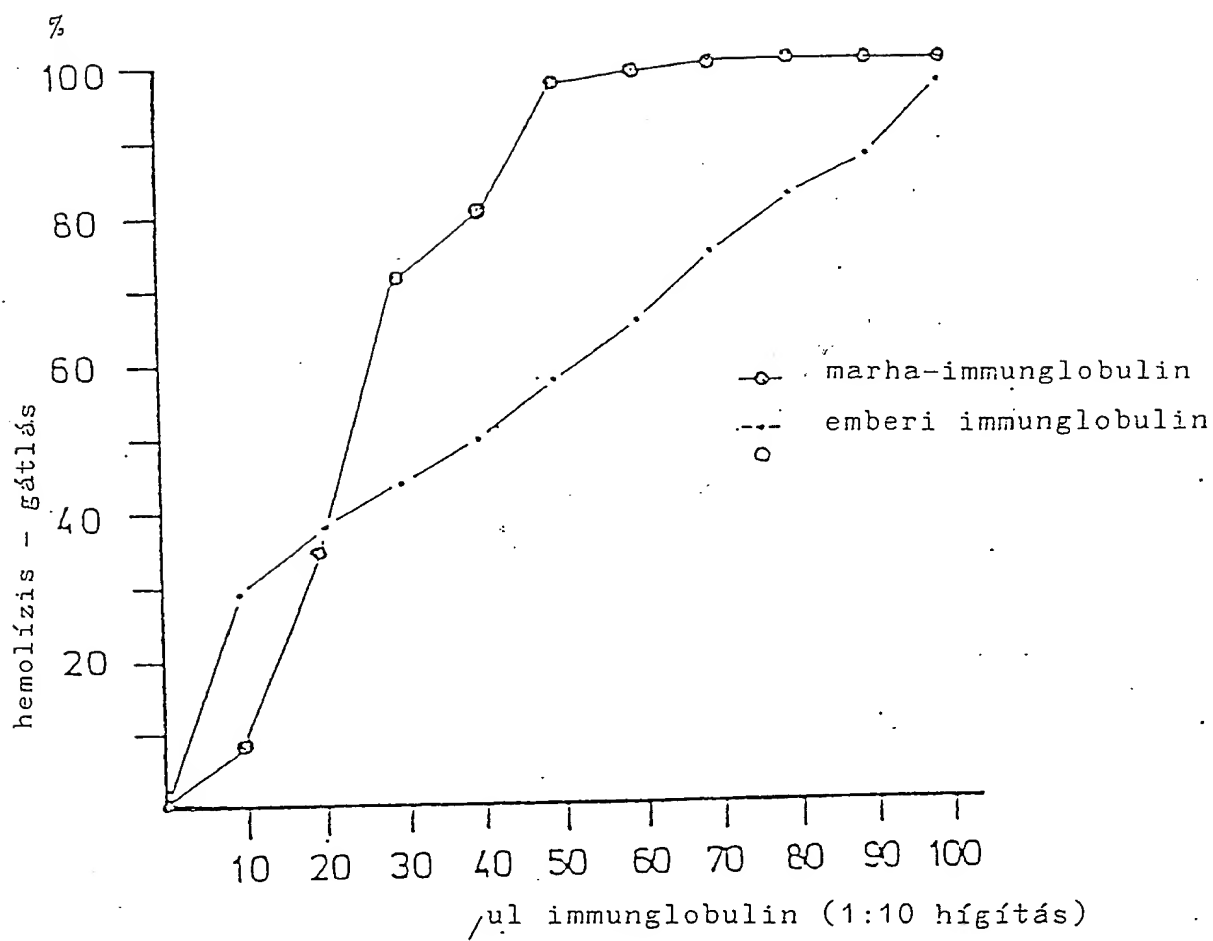


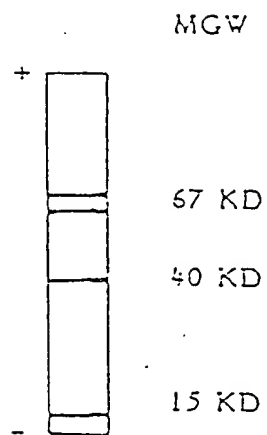
2. ábra



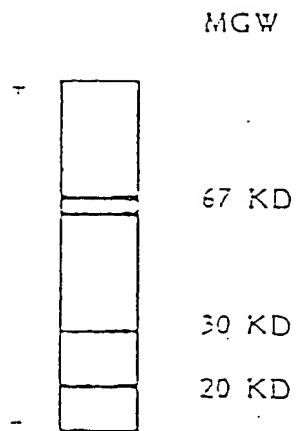


- 3. ábra





4a. abra

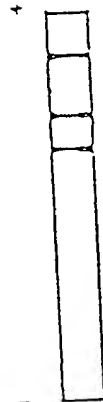


4b. abra

HU 208 089 B

Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

MGW

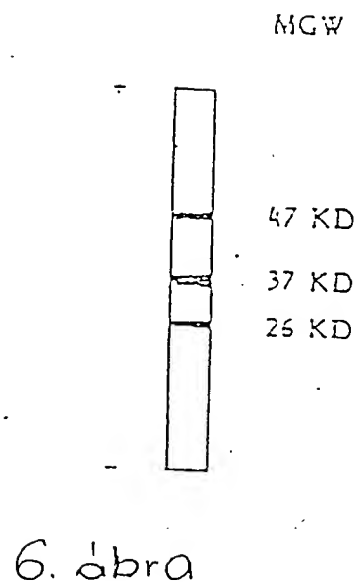


120 KD

69 KD

45 KD

5. abra.



(19) Country Code: HU

PEOPLE'S REPUBLIC OF HUNGARY

National Patent Office

PATENT SPECIFICATION

- (11) Registration no.: **208 089 B**  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> **A 61 K 39/395**
- (21) Filing no.: **2524/89**  
 (22) Filing date: **1989.04.18**  
 (30) Priorities:  
     P 38 13 043 **1988.04.19 DE**  
     88 118243 1988.11.02 **EP**
- (86) Int. filing no.: **PCT/DE 89/00233**  
 (87) Int. publication no.: **WO 89/10139**
- (40) Publication date: **1991.05.28**  
 (45) Date of publication in Patent Journal: **1993.08.30 SZKV 93/08**
- (72) Inventors:  
     Dichtelmüller, Herbert, Sulzbach (DE)  
     Stephan, Wolfgang, Dreieich (DE)  
     Lissner, Reinhard, Weilbach (DE)  
     Arndt, Rüdiger, Hamburg-Blankenese (DE)
- (73) Patentee: **Biotest Pharma GmbH, Dreieich (DE)**  
 (74) Representative: **S. B. G. és K. Ügyvédi és Szabadalmi Iroda, Budapest**  
     **[SBG and K, Law and Patent Office, Budapest]**
- (54) A method for producing immunoglobulin concentrates and medical preparations containing these
- (57) **EXTRACT**

The subject of the invention relates to a method for preparing immunoglobulin from the foremilk (colostrum) of non-immunised cattle. The immunoglobulin content of the active ingredient is high while the anti-complementary activity is low. The preparation is taken orally by humans and administered intravenously to animals either on its own or in the form of a pharmaceutical preparation in the treatment of bacteria or toxin-caused illnesses, serious diarrhoea in AIDS patients or of patients suffering from other immune deficiency diseases, 'traveller's diarrhoea', toxin-caused diarrhoea in infants, stomach and duodenal ulcers, chronic and acute Yersinia infections or illnesses caused by protozoa.

*Description on 14 pages, including 7 pages with drawings*

**HU 208 089 B**

The subject of the invention relates to the production of immunoglobulin from the high antibody content foremilk (colostrum, colostrum milk) of non-immunised mammals, and medicinal preparations which contain this active ingredient or are composed of it, and which can be used in the treatment of bacterial or toxin-caused illnesses, especially AIDS-related diarrhoea and other immune deficiency diseases, traveller's diarrhoea, toxin-caused diarrhoea in infants, stomach and duodenal ulcers, acute and chronic *Yersinia* infections or other illness caused by protozoa (unicellular animal amoeba).

The immunoglobulins (proteins which have a high level of biological activity and are at the same time sensitive) are used in the prevention and treatment of bacterial and viral toxæmia and of toxæmia caused by certain toxins, when they are administered in the form of special preparations. They are obtained by relatively tricky procedures from human blood plasma or by a somewhat simpler method from the milk or colostrum of mammals. Among the classes of immunoglobulin obtained from human plasma is immunoglobulin-G, a protein which can be used in the prevention and treatment of various infections.

The known preparations containing immunoglobulin and produced from milk or colostrum are low in purity, like those obtained from human plasma, and therefore these are primarily used in veterinary use medicine for the treatment of infectious diseases.

Several procedures for obtaining immunoglobulin from milk or colostrum are known. According to US patent no. 3 128 230 a preparation for the treatment of bacterial infections is produced from milk. According to US patent no. 4 265 925 and GB patent no. 0 573 995 a concentrate containing heat-denatured protein, resulting from heat treatment, is produced from a milk serum. Specification no. 28 13 284 published in the Federal Republic of Germany journal and patent nos. 0 046 909 and 0 064 103 in the EPO publication describe how an anti-inflammatory immunoglobulin concentrate can be produced from colostrum.

US patent no. 4 051 235 and Japanese patent no. 6 075 433 also describe a procedure for processing colostrum milk in which products containing immunoglobulin used in anti-inflammatories can be obtained.

A basic substance for production of medical preparations containing immunoglobulin is the milk or foremilk of mammals, primarily cattle, hyperimmunised according to the above procedures, and to achieve an antibacterial or antiviral effect against certain pathogens the animals must be immunised with bacterium strains inducing one or several antibodies or group specific antibodies, or their antigens. The effect of preparations thus produced corresponds to that of the bacterium (bacteria) used for immunisation. If it is desired to produce a preparation, from milk, containing specific antibodies for a given (eg bacterial) antigen the animals must be immunised with the purified antigen. In this way a large enough antibody titre can be obtained for it to be regarded as the carrier material of the specific antibody in the milk.

The aim of the work leading to the elaboration of the invention here described was the production of an immunoglobulin of high purity and high antibody activity by a simple and efficient method which could be used in both human and veterinary medicine but whose production did not involve prior hyperimmunization to ensure the specified antibody level.

The aim is solved here by producing the immunoglobulin from the colostrum of cattle taken within the first 30 hours, preferably the first 10 hours, of calving. In this process the colostrum milk is diluted with distilled water and then pasteurised. The fat is removed and the casein precipitated and then removed. Finally the lactic acid thus obtained from the foremilk is spray dried with an input temperature of 145°C and an output temperature of 65°C. The immunoglobulin active ingredient obtained is of high purity, has an immunoglobulin content in excess of 80% total protein, has a low fat (<0.4%) and lactose (<0.1%) content, and its antibody activity is greater than the most effective known human immunoglobulin preparation, the Pentaglobin® level. Since the anticomplementary activity of the preparation according to the invention is extraordinarily low, it can be taken in a pharmaceutical preparation orally (by mouth) by humans and administered intravenously to animals.

In the procedure according to the invention the colostrum of cattle taken within the first 10 hours of calving is diluted 1:3 with distilled water, the solution is pasteurised, the milk fat removed and the casein precipitated and removed (for example, by filtering); the acid thus obtained is concentrated to the desired amount.

After stabilising by spray drying a powder-type product is obtained. It was noted with astonishment that the required temperature for spray drying (145-180°C input and 65-70°C output temperature) did not denature the proteins in the preparation, thus the known aggregation at such temperatures and anticipated increase in anticomplementary activity did not occur during the drying process. By using this stabilisation method a preparation can be produced with an immunoglobulin content in excess of 80%, with unchanged low anticomplementary activity and full biological activity.

Besides the procedures described above, by using another, likewise known, method before spray drying, namely, precipitation with caprylic acid, the immunoglobulin content of the preparation can be enriched. The immunoglobulin content thus achieved is in excess of 90%, without any increase in anticomplementary activity.

A preparation containing immunoglobulin and with high antibody activity can be produced by other, likewise known, methods, from colostrum taken within 10 hours of calving. Such a procedure is described in FRG patent no. 3 433 718 according to which colostrum milk from non-immunised cattle is first curdled and filtered coarsely (to remove the casein), then diluted with a saline solution and the suspension thus obtained is passed through a tangential filter, concentrated and neutralised. The concentrated whey can be stabilised by spray drying, in this case combining it with precipitation with caprylic acid with the aim of increasing the purity of the preparation.



## *Production of the immunoglobulin preparation*

### *Example 1*

110 kg deep-frozen colostrum milk from cows taken within 10 hours of calving is warmed up to 5-10°C and diluted 1:3 with distilled water. The diluted milk is pasteurised and the milk fat removed. 270 kg of the obtained skimmed milk is curdled with a 1 N hydrochloric acid solution and the casein is filtered through a cloth filter. 186 kg supernatant lactic acid is concentrated to 38 kg through an ultra-fine filter and then preserved by spray drying. The input temperature for spray drying is 175°C and the output temperature is 65°C. The dry powder yield has a 83% immunoglobulin content (3.8 kg). The antibody activity after drying corresponds to the antibody activity measured before drying.

### *Example 2*

13 litres colostrum milk taken within 5 hours of calving and deep-frozen is heated. The milk has a pH of 6.27. The pH is adjusted to 4.8 by adding 700 ml of 1 N hydrochloric acid solution. The suspension is kept at 40°C for 30 minutes and then kept for one night at 4°C. Next day the coarser particles are filtered out using polyamide gauze and the suspension is diluted to 26 litres with a 0.9% normal saline solution, then filtered through a tangential filter cartridge of 3 m<sup>2</sup> surface area, 1.2 mm fibre thick, and 0.4 µm average hole size, with a 100 litre normal saline solution, at 20-60 kPa pressure. The filtrate is further continuously filtered in a second stage, in three filter cartridges each with a surface area of 1.4 m<sup>2</sup>, and a 10 000 dalton separation limit. When diafiltration with a 100 litre 0.9% sodium chloride solution is completed the solution is concentrated to 25 litres and the filtrate containing low molecular weight constituents is flushed.

A 10 litre solution containing 10% immunoglobulin is spray dried at 145/65°C. From this 1270 g white immunoglobulin powder is obtained the antibody and anticomplementary activity of which corresponds to the values measured before the preparation was dried.

### *Example 3*

To a 200 ml immunoglobulin solution prepared according to example 1 is added 2.5% caprylic acid before preservation (pH = 4.8) and the result is kept for 5 hours at 23°C; the precipitate is removed via a sieve and the solution separated by dialysis with a normal salt solution and spray dried. The immunoglobulin content thus obtained is greater than 90% while the anticomplementary activity is lower than with an intravenously administered human IgG preparation.

### *Example 4*

A 200 ml solution containing 5% protein is produced from the immunoglobulin powder (spray dried) obtained according to example 1. The content of proteins in the solution is as follows ( $\pm 10\%$  accuracy):

total protein	4.2 g/100 ml
of this, IgG	3.0 g/100 ml
IgA	0.35 g/100 ml
IgM	0.96 g/100 ml
pH	4.6
lactalbumin	1.0%

The solution is incubated with 2.5% caprylic acid at 4.8 pH, at 23°C, for 5 hours, and then centrifuged and the supernatant diafiltered. The solution's anticomplementary activity corresponds to a similar concentration (5%) of human IgG preparation suitable for administering intravenously.

The antibody activity of immunoglobulin preparations prepared by the methods described or methods analogous to them is higher than that of Pentaglobin.

#### *Neutralisation of bacterium toxins*

The neutralisation of bacterium toxins causing haemolysis is examined in a medium containing various bacterium toxins, using any of the standard procedures indicating haemolysis inhibition.

#### *Example 5*

*Staphylococcus aureus* Smith 3 bacterium strain is cultured overnight in a beef heart broth, then centrifuged three times (10 000 g, 10 minutes) and the supernatant is filtered until sterile. A 5% solution is prepared from the immunoglobulin preparation produced according to example 2, to examine the toxin neutralisation effect. During this procedure, 0.1 ml washed human erythrocyte and 10  $\mu$ l *Staphylococcus aureus* toxin are incubated for 30 minutes at 37°C in a 900-990  $\mu$ l NaCl solution and in the meantime 10-100  $\mu$ l 5% immunoglobulin solution is added repeatedly. A 5% solution prepared from Pentaglobin is used as a comparison preparation.

The results are given in Fig. 1.

#### *Example 6*

The toxin neutralisation test as described in example 5 was performed with a Gram-negative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* toxin-containing supernatant. The test was carried out with a 5% immunoglobulin solution as described in example 5 or 7, having diluted the solution 1:10 with 0.9% NaCl (besides the use of 0-100  $\mu$ l solution).

*Example 7*

The test described in example 5 is carried out with a solution of the preparation prepared (spray dried) as in example 1 diluted 1:10 with normal saline solution, and with the *Staphylococcus aureus* toxin. A similar solution of Pentaglobin was used as a control.

The results of the experiments described in examples 5 - 7 are given in figs. 1 - 3.

Fig. 1 shows the neutralisation of the *Staphylococcus aureus* Smith 3 haemolysing toxin with an immunoglobulin preparation prepared according to example 2 from colostrum milk from cattle, and with Pentaglobin, as a comparison preparation (example 5).

Fig. 2 shows the neutralisation of the *Pseudomonas aeruginosa* toxin with an immunoglobulin preparation prepared according to example 2 from colostrum milk from cattle (example 6).

Fig. 3 shows the neutralisation of the *Staphylococcus aureus* Smith 3 toxin with an immunoglobulin preparation prepared according to example 1 (example 7).

All three figures indicate that the immunoglobulin preparation prepared from the colostrum milk of cattle is more effective at preventing toxin-caused haemolysis than the Pentaglobin used for comparison, and which is prepared from human plasma. The results are given in Table 1.

*Table 1*

Example	Immunoglobulin ( $\mu$ l) required for 50% and 80% toxin neutralisation	
5. Pentaglobulin (comparison)	50	93
Colostrum milk preparation (according to the invention)	10	50
6. Colostrum milk preparation (according to the invention)	18	35
7. Pentaglobin (comparison)	42	80
Colostrum milk preparation (according to the invention)	10	40

According to the measurements recorded for examples 5 and 7 approximately three times the amount of Pentaglobin is required for 50% toxin neutralisation, while twice the amount has to be used for 80% neutralisation. It can be seen from the data for example 6 that a fairly small amount (40  $\mu$ l) of

immunoglobulin prepared according to the invention is enough for almost 100% neutralisation of the Gram-negative bacterium toxin.

Nor was 100% toxin neutralisation was not achieved with Pentaglobin in the dose used (5% 100 µl). Bearing in mind that the immunoglobulin preparation from colostrum milk is, as opposed to Pentaglobin, not 100% but 80-90% pure, it can be deduced from the above fact that the therapy index of antitoxins according to the invention in the area of antitoxin effect is at least twice that of the known Pentaglobin.

It can further be deduced from the Table and from the figure that the method of production does not affect the activity of the preparations according to the invention, and therefore either procedures known to the milk industry or other procedures (for example, filtering) can be used here to produce them.

The products according to the invention can be given orally to humans and administered intravenously as a veterinary product. The following examples show that they are not toxic and can be stored in liquid or solid form.

#### *Compatibility - toxicity*

##### *Example 8*

Five mice of 17 g body weight were prepared intraperitoneally with 0.1 ml immunoglobulin solution made as in example 6-8 (0.29 g immunoglobulin /kg bodyweight). The animals were observed for three hours, and then checked after five days.

Result: No immediate reaction, no delayed reaction (within 3 hours) and no deaths were observed. Neither did the animals display any aberrant behaviour later.

##### *Example 9*

Five mice of 17 g bodyweight were prepared with 0.5 ml 5% immunoglobulin solution (1.47 g immunoglobulin/kg bodyweight, pH = 4.6), administered orally, through a stomach tube. The animals were observed for five hours, and then checked after five days.

Result: No immediate reaction, no delayed reaction (within 5 hours) and no deaths were observed. Neither did the animals display any aberrant behaviour later.

##### *Example 10*

Three mice of 20 g bodyweight were prepared with 1.0 ml 10% immunoglobulin solution (0.1 g immunoglobulin/animal = 5.0 g/kg bodyweight, pH = 4.6), administered orally, through a stomach tube.

Result: After treatment, there was no adverse sign in the animals after 1, 3 and 24 hours, neither did the animals display any aberrant behaviour later.

On the basis of the above it can be established that immunoglobulin preparations prepared from colostral milk can be produced fairly economically and that they have unexpectedly high antitoxin activity in respect of bacterium toxins; their compatibility is outstanding (they are not toxic), they are of a high purity (90%) and they can be stored in liquid or solid form.

#### *Example 11*

It was found, to our astonishment, that the preparations according to the invention can be used in the treatment of diarrhoea associated with HIV-infection (AIDS) or other immune deficiency conditions. Dosage with the preparation according to the invention reduces within a short time the number of motions, and then completely stops the diarrhoea. The results of the treatment of three AIDS patients (10 g preparation/day orally, over 10 days) are given in Table 2.

*Table 2*

Patient	before treatment	Diarrhoea: number of movements/day				Bodyweight	
		day of treatment				before	after
		1	3	5	10		
1	10	5	1	1	1	42.0	(not taken)
2	6	1	0*	0*	0*	84.4	84.5
3	10	5	2	2	1	62.3	62.8

\* normal motions

The preparations according to the invention can be administered either on their own or in combination with other anti-diarrhoea substances (antidiarrhoica, obstipantia), or with other required medication. Since they can, within a short period of time, reduce the number of motions, they can be effective in improving the patient's general condition.

#### *Example 12*

It was found, to our astonishment, that the preparations according to the invention could be used with good results in cases of 'traveller's diarrhoea' and toxic diarrhoea in infants.

Laboratory experiments established that, of the preparations according to the invention, several contained antibodies capable of neutralising verotoxin 1 (VT 1), with a molecular weight of 40 kd. VT 1 (also known as Shiga toxin) and verotoxin 2 are exotoxins of the *Escherichia coli* strain, responsible for the symptoms of diarrhoea in infants. Traveller's diarrhoea, on the other hand, is caused by *Escherichia coli* strains producing enterotoxins; antibodies to heat sensitive enterotoxin proteins, with a molecular weight of 30 and 40 kd, are found in the preparations.

According to the above, preparations according to the invention contain suitable antibodies against the complete toxin stock of pathogenic *E. coli* strains. This property of the preparations is particularly beneficial as these illnesses often occur after treatment with antibiotics, or antibiotic treatments may have negative side effects in patients with toxicosis.

The results of experiments carried out with immunoblot equipment are given in figs. 4a and 4b.

#### *Example 13*

Stomach and duodenal ulcers accompanying gastritis are treated with bismuth salts and antibiotics. The straightforward and side effect-free treatment (bismuth salts) is not effective enough and while the effect of antibiotic combinations is reliable, routine use is often accompanied by side effects; these clinical patterns still demand therapy which is effective yet free of side effects. It is our understanding at this time that in the above clinical patterns and in other digestive ailments (dyspepsia) a causative role is played by *Campylobacter pylori*, its most significant antigens (proteins) being a 120 kd external membrane, a 69 kd cilium (flagellin) and a 45 kd urease enzyme.

During the experiments it was noted with astonishment that the preparations according to the invention contain a large amount of antibodies to all three antigens. Tests were carried out with immunoblot equipment. We used the preparation as a 4 mg/ml solution containing protein, either undiluted, diluted 1:10 or diluted 1:100. A result was achieved with bovine IgG, obtained with alkaline phosphate. Fig. 5 shows that the preparation, twice diluted, reacts with all three antigens; if diluted 100 times, it reacts demonstrably well with the flagellin and the urease. Apart from the above, there were several antibodies which reacted with the preparation prepared from *C. pylori*.

To our astonishment, it was established from the above that preparations according to the invention could be used in the treatment of infections caused by *Campylobacter pylori*.

#### *Example 14*

*Yersinia* infections occur not or not only as acute enteritis but mainly in the form of subacute or chronic clinical patterns, in which case it is usually to no avail to culture the pathogen and immune-origin tissular responses dominate the picture. The most important of these illnesses (in which an

increase in IgA antibodies signifies infection) are reactive arthritis, erythema nodosum, uveitis (inflammation of the middle layer of the eyeball) and chronic enteritis.

Both of the *Yersinia* types have a third, YOP, antigen (YOP2b = 47 kd, YOP3 = 37 kd, YOP5 = 26 kd). The reaction between the isolated antigens and the preparation according to the invention was studied using Western-blot equipment. We used the preparation as a 4 mg/ml solution containing protein, either diluted 1:10 or diluted 1:100. Figs. 6 and 7 show that the preparation reacted with all three antigens, even with a hundred times dilution. A result was achieved with anti-cattle-IgG (H and L chain specific) linked to alkaline phosphatase, in a 1:1500 and 1:3000 dilution.

Since the antigens examined were common in all strains throughout the whole *Yersinia* species it could be established that the preparations according to the invention were of eminent use in the treatment of *Yersinia* infections.

#### *Example 15*

Preparations according to the invention can, to our astonishment, be used in the treatment of illnesses caused by protozoa, for example *Cryptosporidia*, *Isospora belli* or *Toxoplasma Gondii*, where for several of these illnesses there is as yet no effective medication.

*Cryptosporidia* can cause such severe diarrhoea that there is no effective treatment available to us, especially for immune deficiency patients. Four patients suffering from severe diarrhoea in whose motions *Cryptosporidium* had been detected were treated daily with 10 g of the preparation, over a period of 10 days (the preparation was dissolved in juice). At the end of the treatment no trace of *Cryptosporidium* antigens could be detected in the patients.

## CLAIMS

1. A procedure for producing immunoglobulin active agent from the foremilk (colostrum) of cattle taken within 30 hours, preferably 10 hours, of calving, by the dilution of the foremilk in distilled water, pasteurising the diluted foremilk, removing the milk fat, and precipitating and removing the casein characterised in that the foremilk lactic acid thus obtained is spray dried with an input temperature of 145-180°C and an output temperature of 65-70°C. (Priority: 19 April 1988.)
2. The procedure according to claim 1 characterised in that the foremilk lactic acid is concentrated before spray drying. (Priority: 19 April 1988.)
3. The procedure according to claims 1 or 2 characterised in that the foremilk lactic acid is treated with caprylic acid before spray drying. (Priority: 19 April 1988.)
4. A procedure for the production of a medicinal preparation suitable for the treatment of bacteria-, protozoa- or toxin-caused illnesses, stomach and intestinal diseases or immune deficiency conditions characterised in that the active agent produced according to any of the claims is formed in the known way by mixing with a usual pharmaceutical preparation base ingredient or on its own. (Priority: 2 November 1988.)



**208 089 B**Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

Fig. 1

x-axis: immunoglobulin type (1:10 dilution)

y-axis: haemolysis inhibition

o bovine immunoglobulin

— human immunoglobulin

**208 089 B**Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

Fig. 2

x-axis: immunoglobulin type (1:10 dilution)

y-axis: haemolysis inhibition

**208 089 B**Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

Fig. 3

x-axis: immunoglobulin type (1:10 dilution)

y-axis: haemolysis inhibition

-o- bovine immunoglobulin

-\_- human immunoglobulin

**208 089 B**

Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

Fig. 4a

**208 089 B**

Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

Fig. 4b

**208 089 B**

Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

Fig. 5

**208 089 B**

Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395

Fig. 6